Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 3, Fall 2020, P. 309-324

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۳۲۴-۳۰۹

مقاله علمی-پژوهشی

بهینه‌سازی روش‌های مولکولی شناسایی نماتد عامل ریشه‌گره‌ای (*Meloidogyne javanica*)

رحمان کشاورز کوهجردی[1*]- علی پاک نیت جهرمی[2]- مهرزاد هنرور[3]- مجید پاک نیت جهرمی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۵

چکیده

به منظور شناسایی سریع مراحل مختلف رشدی گونه *Meloidogyne javanica* که در ایران به عنوان یکی از خسارتزاترین نماتدهای گیاهی شناخته شده، تعداد ۴۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتد ریشه‌گره‌ای از نقاط مختلف جالیزکاری استان فارس (داراب، جنت شهر، استهبان، نورآباد، کوار و شیراز) جمع‌آوری گردید. پس از خالص‌سازی به روش تک کیسه تخم روی ریشه گوجه فرنگی رقم Rutgers و شناسایی گونه *M. javanica* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی (مورفولوژی) و ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لارو سن دوم، DNA ژنومی کلیه مراحل رشدی از مرحله تخم، لارو سن دوم و ماده‌های بالغ نماتد، به سه روش ژانگ، سیلوا و لیوآ استخراج شد. DNA استخراج شده با کمک جفت آغازگرهای اختصاصی گونه Fjav/Rjav, Mj-MF/Mj-MR, Mj-DF/Mj-DR تکثیر گردید. در کلیه مراحل رشدی گونه *M. javanica* یک قطعه ۱۶۵۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر Mj-DF/Mj-DR، یک قطعه ۵۱۷ جفت بازی توسط جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR و یک قطعه ۶۷۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر Fjav/Rjav تکثیر شد ولی این قطعات با جفت آغازگر MI-F و MI-R، مربوط به نماتد *M. incognita* و آب که به عنوان کنترل منفی در آزمایش استفاده شده بودند تکثیر نشدند. لذا به نظر می‌رسد کاربرد این جفت آغازگرها در قیاس با خصوصیات ریخت‌شناسی در مراحل مختلف رشدی نماتد به تشخیص سریع تر گونه *M. javanica* منجر می‌شود. در بهینه‌سازی PCR برای تشخیص نماتد *M. javanica* بهترین دما برای آغازگرهای Mj-MF و Mj-MR، ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای Mj-DF و Mj-DR، ۵۰ درجه سانتی‌گراد و برای Fjav و Rjav، ۵۴ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید، میزان DNA الگو حاصل از روش‌های مختلف استخراج در آزمون PCR در خصوص ماده کامل و کیسه تخم از یک میکرولیتر به دو میکرولیتر و لارو سن دوم از دو میکرو لیتر به چهار میکرولیتر بهترین نتیجه حاصل شد. در خصوص MgCl2 با افزایش میزان آن از ۱/۵ میلی‌مولار به ۲ میلی‌مولار در واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR بهترین نتیجه حاصل گردید. بهترین روش استخراج که قادر به ردیابی تک لارو سن دوم نماتد بود روش لیوآ در نظر گرفته شد. بهترین آغازگرها که قادر به ردیابی نماتد *M. javanica* در تمام مراحل رشدی بودند، جفت آغازگرMj-MR/Mj-MF و Rjav/Fjav بودند.

واژه‌های کلیدی: آغازگر اختصاصی، بهینه سازی PCR، نماتد ریشه گرهی، *M. javanica*

مقدمه

نماتدهای ریشه گرهی متعلق به جنس *Meloidogyne* می‌باشند. این نماتدها یک گروه بسیار پلی فاژ با اهمیت اقتصادی بسیار زیاد می‌باشند که در سراسر دنیا گسترش یافته‌اند و تقریبا به تمام گیاهان عالی حمله می‌کنند. شدت خسارت وارده توسط نماتدهای ریشه گرهی به گونه نماتد، گیاه میزبان، تناوب زراعی، فصل زراعی و نوع خاک بستگی دارد (۱۴).

روش‌های مبتنی بر پی‌سی‌آر[5] باعث ایجاد انقلابی در تاکسونومی نماتدها و مطالعه ژنتیک آن‌ها شده است، چرا که این روش‌ها حساسیت بالایی دارند و امکان تکثیر ژن‌های مختلف را در این

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، رشته مهندسی کشاورزی علوم باغبانی، بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد استهبان
(*- نویسنده مسئول: Email: rahman.keshavarz64@gmail.com)
۲ و ۴- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زرقان، ایران
۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد استهبان، گروه بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، استهبان، ایران

5- PCR

DOI: 10.22067/jpp.v34i3.84588

موجودات فراهم آورده‌اند. همچنین غالبا بدست آوردن مقدار کافی از DNA، حداقل در مورد بعضی از نماتدها یا در بعضی از مراحل زندگی آن‌ها، کاری سخت و اغلب غیر ممکن است که روش‌های مبتنی بر پی‌سی‌آر این مشکل را بر طرف کرده‌اند (۸). هم اکنون روش‌های کلاسیک تاکسونومی تا حد زیادی توسط روش‌های مولکولی کامل شده‌اند. در بعضی از نقاط دنیا، روش‌های مولکولی جایگزین روش‌های سخت و وقت گیر میکروسکوپی شده اند، هر چند که تقریبا اجماع جهانی بر این است که در کنار روش‌های مولکولی، روش‌های کلاسیک نیز باید انجام شوند و این دو روش نواقص همدیگر را پوشش می‌دهند (۳).

اسبنشاد و همکاران (۱۹۸۵) ۳۰۰ جمعیت از ۱۶ گونه *Meloidogyne* را که از چند کشور دنیا جمع‌آوری شده بود مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی از آنزیم‌های استراز، مالات دهیدروژناز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتامات اگزوالواستات ترانس آمیناز استفاده شد و در میان آن‌ها استرازها به عنوان نشانگر بیوشیمیایی مطلوب برای شناسایی گونه‌های اصلی *Meloidogyne* مفید تشخیص داده شدند (۵).

مهدیخانی مقدم و همکاران (۲۰۰۶) پس از خالص‌سازی جمعیت‌های مختلف دو گونه مهم نماتد ریشه‌گره‌ای در ایران، *M. javanica* و *M. incognita* از ماده‌های بالغ و لارو سن دوم پروتئین استخراج کردند و برای تفکیک پروتئین‌های محلول از روش SDS-PAGE استفاده نمودند. نقوش پروتئینی مربوط به جمعیت‌های مختلف هر یک از دو گونه که از میزبان‌های مختلف جدا شده بودند، سطح بالایی از تشابه را نشان دادند. در این بررسی شش فنوتیپ پروتئینی برای جمعیت‌های گونه *M. javanica* و چهار فنوتیپ پروتئینی برای جمعیت‌های گونه *M. incognita* مشاهده گردید. این تحقیق نشان داد که با استفاده از پروتئین کل سلولی می توان دو گونه مذکور را از هم تفکیک کرد اما جمعیت‌های درون گونه‌ای از هم قابل تفکیک نیستند (۱۱).

آدام و همکاران (۲۰۰۵) برای شناسایی گونه‌ها مختلف *Meloidogyne* در لیبی از چهار روش بررسی مورفولوژیکی، ایزوزایم، اسکار[1] و رپید[2] استفاده کردند و در میان این روش‌ها، رپید را برای تفکیک گونه‌های این جنس مطلوب تر از بقیه روش‌ها ارزیابی کردند و حتی توانستند تعدادی از جمعیت‌های ناشناخته این جنس را که از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت بودند در سطح گونه شناسایی کنند (۱).

عسکریان و همکاران (۱۳۸۴) برای بررسی تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف *M. javanica* و *M. incognita* در باغات پسته استان کرمان از تکنیک رپید استفاده کردند. نتایج حاصله از تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف هر گونه بود. جمعیت‌های *M. javanica* حدود ۹۱٪، و جمعیت‌های *M. incognita* حدود ۸۶٪ به هم شباهت داشتند (۲).

فدوی خلاجو و همکاران (۱۳۸۹) تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بین جمعیت‌های مختلف *M. javanica* در مزارع گوجه فرنگی استان خراسان شمالی با استفاده از نشانگر PCR-RAPD بررسی کردند. آن‌ها برای به دست آوردن جمعیت خالص، یک توده تخم از ریشه‌های آلوده مناطق مختلف جداسازی و به گوجه فرنگی تلقیح کردند. در مطالعه آنها استخراج DNA بر اساس روش سیلوا و همکاران بود. نتایج آنها نشان داد روش رپید نمی‌تواند جمعیت‌ها را بر اساس مناطق جغرافیایی جدا کند و همچنین تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت‌های مختلف *M. javanica* مشاهده نشد (۶).

مکرم حصار و همکاران (۲۰۱۰) تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی بین جمعیت‌های گونه *M. javanica* روی میزبان‌های مختلف در مزارع استان خراسان رضوی بررسی کردند. مطالعات مورفومتریکی شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتدهای ماده و نیز خصوصیات مورفومتریکی لاروهای سن دوم شناسایی شدند. برای تایید مطالعات مورفولوژیکی از آغازگرهای اختصاصی گونه *M. javanica* به نام‌های OPAFjav و OPARjav استفاده شد. تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها از طریق نشانگر رپید با استفاده از ۱۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی بررسی شد. بر اساس نتایج این مطالعه تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* اثبات شد اما ارتباط کاملی بین این دو روش گروه‌بندی مشاهد نشد (۱۵).

زیجلسترا (۲۰۰۰) با استفاده از روش اسکار–پی‌سی‌آر[3] به عنوان یک روش قدرتمند برای شناسایی مطمئن جمعیت‌ها و افراد گونه‌های *M. chitwoodi, M. fallax, M. hapla* که دارای صفات مشترک هستند استفاده کرد. این گونه‌ها با کاربرد این روش چندگانه با استفاده از سه جفت آغازگر آشیانه‌ای شناسایی و توصیف شد. در این مطالعه آزمون‌های تشخیصی بهینه‌سازی شد و همچنین فایده تبدیل کردن مارکرهای رپید به مارکرهای اسکار مورد بحث قرار گرفت (۱۹).

دونگ و همکاران (۲۰۰۱) بعد از انجام واکنش رپید و با استفاده از توالی‌یابی باندهای اختصاصی که برای هرگونه پیدا کردند، جفت آغازگرهای اختصاصی اسکار را برای گونه‌های *M. incognita, M. javanica* و *M. arenaria* طراحی کردند. آنها همچنین با استفاده از اسکار–پی‌سی‌آر برای گونه‌های *M. arenaria, M. hapla, M. incognita* و *M. javanica* آغازگرهای اختصاصی اسکار را طراحی کردند (۴). در پژوهشی فارگت و همکاران (۲۰۰۵) تنوع ژنتیکی

1- SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)
2- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
3- SCAR-PCR

گونـه‌هـای *M. incognita, M. arenaria, , M. hapla, M. mayaguensis, M. chitwoodiM.*، *M. falax* و *M. javanica* را با استفاده از نشانگر AFLP بررسی کردند و تنـوع ژنتیکـی بـالایی را برای دو گونه اخیر گزارش نمودند (۷).

مهدیخانی مقدم و همکاران (۲۰۰۶) برای تفکیک دو گونه عمـده نماتد ریشه گرهی در ایران از روش پی‌سی‌آر استفاده کردند. آنها پـس از استخراج DNA از تخم و لاروهای سن دوم جمعیت‌هـای مختلـف دو گونه *M. incognita* و *M. javanica*، با اسـتفاده از آغازگرهـای اختصاصی قسمتی از DNA میتوکندریایی را تکثیر دادنـد. در مطالعـه آنها قطعات تکثیری با آنزیم‌های برشی *Alu*I، *Dra*I و *Hinf*I بـرش داده شدند. دو آنزیم برشی *Alu*I، *Dra*I هیچ گونـه برشـی در قطعـه DNA تکثیر شده ایجاد نکردند اما آنزیم *Hinf*I نقـوش مشخصـی را برای جمعیت‌های *M. javanica* و *M. incognita* ایجاد نمود (۱۲). در پژوهشی شکوهی و همکاران (۱۳۹۱) بر اساس توالی یـابی ناحیـه ITS دی ان آ ریبوزمی نماتد ریشه‌گـره‌ای *Melodgyne* spp. نشـان دادند این گونه مشابه گونه *M. javanica* است. (۱۶).

شناسایی دقیق نماتدها با استفاده از روش مرفولوژیکی، مولکولی، میزبان و همه‌گیرشناسی[1] لازم و کاربردی است. همچـنین اسـتفاده از روش‌های موثر کنترل نیز مستلزم شناسایی صحیح آن‌هـا مـی باشـد. شناسـایی نماتـدها غالبـا بـر اسـاس خصوصـیات مورفولوژیـک و مرفومتریـک انجـام مـی شـود و در بعضـی مـوارد نـوع میزبـان و میزبان‌های افتراقی نیز در شناسایی آن‌ها دخالـت دارنـد. خصوصـیات بیوشیمایی و نیز روش‌های مبتنی بر اسـیدهای نوکلئیـک، روش‌هـای جدیدتری است که مـی‌توانـد ابهامـات روش مرفولوژیـک را برطـرف نماید (۸). هدف از این مطالعه بهینه سازی روش‌های مولکولی بـرای شناسایی سریع مراحل مختلف رشدی گونه *M. javanica* است.

مواد و روش‌ها

در سـال ۱۳۹۱ طـی بازدیـدهـایی کـه بـه منـاطق مختلـف جالیزی‌کاری استان فارس صورت گرفت تعداد ۴۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتد ریشه‌گره‌ای جمع آوری گردید (جدول ۱). برای بدسـت آوردن جمعیت خالص از هر نمونه، یک کیسه تخم بزرگ کـه حـاوی تعداد تخم بیشتری بود، انتخاب گردید. سپس به تعداد گلدان‌هایی که از قبل آماده شده بودند، کیسه تخم جدا شده در مجاورت نشاء گوجـه فرنگی رقم Rutgers قرار گرفت، بعد از گذشت ۷۰-۶۰ روز ریشه‌هـا از گلدان خارج و برای نمونه‌برداری به منظور تشخیص گونه و تکثیـر مجدد نماتدها آماده شدند. جهت اسـتخراج DNA و شناسـایی نماتـد ریشه‌گره‌ای با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مـراز سـه روش مـورد استفاده قرار گرفت.

استخراج به روش CTAB

روش ژانگ و همکاران (۱۸) همراه با تغیرات به شرح زیـر انجـام گرفت. ابتدا روی یک لام سه قطر آب استریل گذاشـته و مـاده‌هـای کامل و دیگر مراحل رشدی نماتد که از بافت استخراج شده بودنـد در این سـه قطـره آب شستشـو شـد. سـپس داخـل اپنـدروف‌هـای ۰/۵ میلی‌لیتری بـه تعـداد ۱۰ عـدد نماتـد داخـل ۵۰ میکرولیتـر CTAB گذاشته و یک سانتریفوژ کوتاه انجام شـد. بـا کمـک سـرتیپ در زیـر بینکولر نماتـدها لـه شـدند و سـپس ۵ میکرولیتـر لیـزوزیم بـافر (۲۰ میلی‌گرم لیزوزیم در ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCL با pH=8) اضافه شد و در حمام بنماری و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت۳۰ دقیقـه نگه‌داری شد. نمونه‌ها هر ۵ دقیقه یک بار ورتکس شـدند. سـپس ۵۰ میکرولیتر کلروفرم ایزامیل الکل به نسبت (۲۴:۱) اضافه و به مـدت ۵ تا ۱۵ دقیقه شیک گردید سپس سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ به مـدت ۱۵ دقیقه انجام شد. فاز رویی با دقت برداشـته و داخـل اپنـدورف جدیـد ریخته شد. دو برابر حجم فاز رویی ایزوپروپانل سـرد اضـافه گردیـد و چند بار با دست تکان داده شد و در فریزر ۲۰- درجه سـانتی‌گـراد بـه مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شد. سپس با سـرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقـه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. مواد رویی بیرون ریخته و با ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ به آرامی عمل شستشو انجام گرفت. سـپس بـر روی دستگاه هات پلیت در دمای ۶۵ درجه گذاشته تـا الکـل خشـک شود. بعد از خشک شدن ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترون اضافه و نیم ساعت در هوای آزاد گذاشته شد تـا DNA خـوب حـل گـردد، برای تعیـین کمیـت و کیفیـت DNA از مراحـل رشـدی مختلـف از الکتروفورز ژل اگارز استفاده گردید (۱۸).

استخراج به روش سیلوا

روش سیلوا همراه با تغییرات به شرح زیر انجـام گرفـت. در ایـن روش ابتدا سه قطر آب استریل روی یک لام قرار داده شد و ماده‌های کامل که از بافت بیرون آورده شدند در ایـن قطـره‌هـای آب شستشـو شـدند و بـه داخـل اپنـدورف‌هـای ۱/۵ میلـی‌لیتـری کـه حـاوی ۵۰ میکرولیتـر آب دوبـار تقطیـر اسـتریل مـی‌باشـد قـرار داده شـد. ایـن اپنـدورف‌هـا بـه مـدت ۵ دقیقـه بـا ۱۰۰۰۰ دور سـانتریفوژ شـدند. اپندورف‌ها به مدت ۵ دقیقه در ازت مایع نگه‌داری شـدند. بـا سـرتیپ که قبلا روی شعله منفذ آن مسدود شده بود، نماتدهای مورد نظـر لـه شد و مقدار ۷۰۰ میکرولیتـر بـافر اسـتخراج (Tris 0.25gr, EDTA 0.15gr, Nacl 1.6gr. β-mercaptoethonol 50μl, Water 20ml) به آنها اضافه شـد و ۳۰ دقیقـه در حمـام آب گـرم در دمـای ۶۵°c درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

1- Epidemiology

جدول ۱- مناطق نمونه‌برداری شده و تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده در هر منطقه از جالیزکاری استان فارس

Table 1- Sampled areas and the number of samples collected in each area of Fars Province

کد نمونه Sample code	نام شهرستان Name of county	مناطق نمونه‌برداری sampling areas	گلخانه Greenhouse	مزرعه Farm	تعداد نمونه Number of samples
R	نورآباد Nourabad	رستم Rostam	خیار Cucumber		3
K	داراب Darab	فسارود Fasaroud		خیار Cucumber	5
N	داراب Darab	فسارود Fasaroud		گوجه فرنگی Tomato	5
G	داراب Darab	فسارود Fasaroud		بادمجان Eggplant	5
J	داراب Darab	جنت شهر Janatshahr	خیار Cucumber		10
F	استهبان Estahban	ایج Ij	خیار و ریحان Cucumber and Basil		5
P	کوار Kavar	کوار Kavar		گوجه فرنگی Tomato	3
H	شیراز Shiraz	باجگاه Bajgah	گوجه فرنگی Tomato		2
B	شیراز Shiraz	منزل مسکونی House		بادمجان Eggplant	2

سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه قرار داده شد. در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه با ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و فاز رویی برداشته و به میکرو تیوپ جدید منتقل شد و هم حجم آن، مخلوط کلروفرم- ایزوامیل الکل به نسبت (۲۴:۱) اضافه و پس از یک تکان شدید و مخلوط شدن کامل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام این مرحله فاز رویی به اپندورف جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و ۵ دقیقه شیک شد و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰- درجه قرار می‌دهیم. سپس محتویات اپندورف به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد. فاز رویی به آرامی بیرون ریخته و رسوب حاصله با الکل ۷۰ درصد شستشو شد. سپس اپندورف مورد نظر روی دستگاه هات پلیت با دمای ۶۵ ^{o}c درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا کاملا خشک شود. ۳۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر سترون اضافه شد و ۳۰ دقیقه در هوای اتاق نگهداری شد تا DNA کاملا حل شود و پس از چند بار ورتکس در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۱۸).

استخراج به روش لیوآ

روش لیواَ همراه با تغییرات در این روش تک ماده خارج شده از بافت پس از شستشو در میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتری که ۱۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون شده بود قرار گرفت و با سرتیپ زرد که منفذ آن روی شعله مسدود شده بود زیر بینکولر نماتد مورد نظر له گردید. سپس ۲۰ میکرو لیتر بافر استخراج (0.2M Nacl, 0.2M Tris-Hcl (pH8) ,1%(V/V) β-Mercaptoethanol) اضافه و ۴ میکرولیتر لیزوزیم بافر(۲۰ میلی‌گرم لیزوزیم در ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCL با pH=8) اضافه گردید و ۱۰ دقیقه در ازت مایع و یک ساعت در ۶۵^{o}c درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در ۹۵^{o}c درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. میکروتیوپ‌ها در فریزر ۲۰- قرار داده شد. تمام مراحل استخراج DNA برای تمامی مراحل رشدی نماتد یکسان می‌باشد فقط نحوه خرد کردن لارو سن دوم متفاوت بود که ابتدا ۱۶ میکرولیتر آب درون راک الیزا ریخته و لارو مورد نظر درون آن قرار داده شد و با سوزن صفر حشره‌شناسی زیر بینوکولر له گردید و ۱۶ میکرولیتر آب درون رک با سمپلر برداشته درون میکروتیوپ ریخته مراحل بعد تکرار گردید (۱۴).

رقیق‌سازی آغازگرها

برای هر جفت آغازگر جدول ۲ بر طبق برگ اطلاعات شرکت سازنده که شامل اطلاعات مانند OD می‌باشد و مولاریته هر آغازگر محاسبه و آب دیونیز تزریقی برای رقیق‌سازی اضافه گردید. آغازگرها به صورت لایفولایز Lypholyse بوده و جامدکه باید رقیق‌سازی شود. ابتدا توسط سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۴ دقیقه میانگریزسازی گردیده وسپس هر جفت آغازگر ۱۰ برابر رقیق گردیدند. رقت آن برابر ۱۰ میلی‌مولار در هر میکرولیتر تنظیم ودما اتصال هر آغازگر بر اساس فرمول زیر محاسبه شد

$$T_{anneal}=(4\times (G+C) + 2\times (A+T) -5$$

جدول ۲- نام آغازگرها همراه با توالی و دمای Tm آن‌ها و دمای اتصال بر اساس فرمول

Table 2- The names of the primers along with their sequence and temperature Tm and connection temperature according to the formula

ردیف Row	نام آغازگر **Primer name**	توالی **Sequence**	منبع **Reference**	طول قطعه **Fragment length**	دمای Tm براساس شرکت تولید کننده **Temperature Tm based on the manufacturer**	دمای Annealing براساس فرمول **Annealing temperature according to the formula**
1	MJ-DF	5´CCTTAATGTCAACACTAGAGCC3´	Dong et al., 2001b	1650bp	60	59
	MJ-DR	3´GGCCTTAACCGACAATTAGA5´			56	
2	MJ-MF	5´ACGCTAGAATTCGACCCTGG3´	Meng et al., 2004	517bp	60	57
	MJ-MR	3´GGTACCAGAAGCAGCCATGC5´			63	
3	Fjav	5´GGTGCGCGATTGAACTGAGC3´	Zijlstra et al., 2000	670bp	63	59
	Rjav	3´CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC5´			65	
4	MI-F	5´GTGAGGATTCAGCTCCCCAG3´	Meng et al., 2004	955bp	63	59
	MI-R	3´ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC5´			65	

برای شناسایی نماتدها از روش‌های مورفولوژیکی و مورفومتریک با کمک آغازگرهـای اختصاصی گونـه *M. javanica* از روش‌هـای مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون PCR

بـرای شناسـایی گونـه *M. javanica* و تاییـد شناسـایی مورفولوژیکی، از سه جفت آغازگر اختصاصی بـه نـام‌هـایMj-DF و Mj-DR (۴) که یـک قطعـه اختصاصـی 1650 bp ایجـاد مـی‌کنـد، آغازگر Mj-MF و Mj-MR (۱۳) که باند اختصاصـی 517bp ایجـاد می‌کند وآغازگر Fjav و Rjav (۲۰) که یک قطعه اختصاصی 670bp ایجاد می‌کند استفاده گردیـد. آغـازگر Mi-F و Mi-R (۱۳) کـه یـک قطعـه اختصاصـی 955bp ایجـاد مـی‌کنـد و مربـوط بـه گونـه *M. incognita* می‌باشد نیز استفاده گردید. توالی این آغازگرها در جـدول ۲ آورده شده است. مخلوط واکنش پی‌سی‌آر، بر اساس جدول ۳ تنظیم و سپس بهینه گردید.

جدول ۳- اجزای واکنش PCR برای جفت آغازگرهای اختصاصی *M. javanica*

Table 3- PCR reaction components for specific primer pairs of *M. javanica*

مواد مصرفی **Consuming materials**	مقدار مورد استفاده
بافر PCR(10X) PCR buffer (10X)	2.5µl
کلرور منیزیوم 50mM($MgCl_2$) Magnesium Chloride 50 mM (Mgcl2)	0.75µl
آغازگر رفت (10mM) Forward Primer	1µl
آغازگربرگشت (10mM) Reverse Primer	1µl
DNA الگو DNA template	1µl
آب مقطر استریل Sterile distilled water	18µl
DNTP 10mM	0.5µl
آنزیم *Taq* Taq enzyme	0.25µl
حجم نهایی the final Volume	25µl

مخلـوط واکـنش درون یـک تیـوپ 0.2ml ریختـه شـد. برنامـه پی‌سی‌آر برای هر جفت آغازگر بهینه گردید (جدول ۴). دمای اتصـال بر اساس هر آغازگر به طور جداگانه بهینه‌سازی گردید که هر آغـازگر بر اساس Tm شرکت سازنده، فرمول، دمای منابع و بهترین دمایی که در این تحقیق به آن دست یافتیم بهینه شد.

جدول ۴- برنامه پی‌سی‌آر برای جفت آغازگرها مختلف

Table 4- PCR program for different primer pairs

مرحله Stage	زمان Time	تعداد سیکل Number of cycles	دما Temperature
واسرشت اولیه Initial denaturation	۱۰ دقیقه 10 min	1	95
واسرشت Denaturation	۱ دقیقه 1 min	38	95
اتصال Annealing	۱ دقیقه 1 min	38	*
گسترش Extension	۱/۳۰ دقیقه 1.5 min	38	72
Final Extension	۱۵ دقیقه 15 min	1	72

* دمای اتصال برای هر جفت آغازگر که با ستاره مشخص شده است بر طبق دمای محاسبه شده و سپس بهینه گردیده است. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ۷۵ و آمپر ۷۵ به مدت یک ساعت نیم الکتروفورز گردید و سپس در تانک حاوی اتادیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید و به مدت یک دقیقه در آب شستشو داده شد. سپس در دستگاه ژل داکیومنت مدل GBOX قرار گرفت و عکس‌برداری گردید.

*The annealing temperature for each pair of primers marked with an asterisk is used according to the temperature calculated and then optimized. Electrophoresis of the samples was electrophoresed in 1% agarose gel with 75 volts and 75 amps for half an hour and then stained in a tank containing ethidium bromide for 10 minutes and washed in water for one minute. Then it was placed in GBOX document gel system and photographed.

نتایج و بحث

نتایج حاکی از این بود که تمامی نمونه‌ها از گونـه *M. javanica* بود بجز نمونه B که از لحاظ مرفولوژیکی و مولکولی بـا آغازگرهـای موجود شناسایی نشد. نتایج در جدول ۵ تنظیم شده است.

نتایج حاصل از پی‌سی‌آر نمونه‌هـای منـاطق مختلـف روی نماتـد مـاده بـالغ بـا جفـت آغـازگر Fjav/Rjav جهـت ردیـابی نماتـد *M. javanica* و جفـت آغـازگر Mi-F/Mi-R جهـت ردیـابی نماتـد *M. incognita* در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه شیراز با کـد (B) با جفت آغازگرهای Fjav/Rjav و Mi-F/Mi-R نتایج منفی بود کـه در شکل ۱ و ۲ قابل مشاهد می‌باشـد. نمونـه B همچنـین بـا جفـت آغازگرهای دیگر که مربوط به گونه *M. incognita* بود آزمایش شـد که نتایج منفی بود. این امکان وجود دارد که ایـن نمونـه یـک گونـه جدید از نماتد ریشه گرهی برای منطقه شیراز باشد. همان طور کـه در شکل ۱ مشاهد می‌گردد نتایج حاکی از این است که عامل نماتد ریشه گرهی در اکثر مناطق استان گونه *M. javanica* مـی‌باشـد. در مـورد جفت آغازگر Mi-F/Mi-R که قادر به ردیابی گونه *M. incognita* از نماتد ریشه‌گره‌ای می‌باشد هیچ باندی در کل نمونه‌ها حاصل نگردیـد. همچنین در مطالعات مرفولوژی نمونه B شناسایی نشد.

برای این منظور اندازه‌گیری خصوصیات میکرومتری با توجـه بـه صفات مورد نیاز برای شناسایی گونه‌های مختلـف ایـن نماتـدها از ۸ منطقه ماده‌های کامـل و لارو سـن دوم مـورد بررسـی قـرار گرفتنـد. داده‌های بدست آمـده در جـدول ۶ تنظـیم گردیـد. از اطلاعـات ایـن جدول می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌های ماده‌ها بـالغ و لارو سـن دوم که در این مطالعه بررسی شدند مـی‌تواننـد متعلـق بـه گونـه *M. javanica* باشند که با نتایج مولکولی مطابقت دارد.

بهینه سازی استخراج DNA

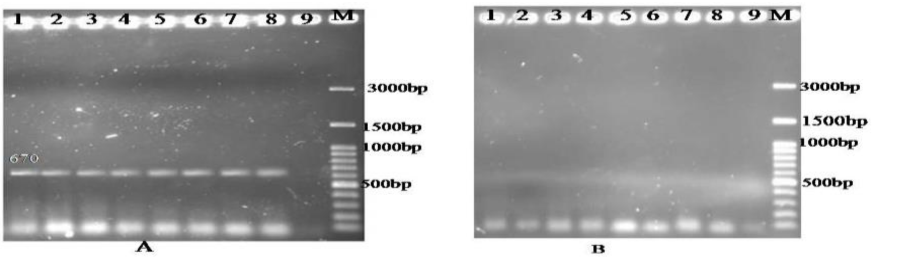
در روش‌های توصیه شده سه گانـه اسـتخراج DNA مربـوط بـه ژانگ، سیلوا و لیوآ تنها با ۲۰ نماتد بالغ در آزمون پـی‌سـی‌آر قـادر بـه ردیابی نماتد بودند. اما در روش‌های بهینه شده هم با تعداد ۱۰ نماتـد بالغ و هم با تک نماتد بالغ و همچنین در مراحل مختلـف رشـدی بـا کمک تک کیسه تخم نماتد و تک لارو نماتد قادر بـه ردیـابی بودنـد (جدول ۷). به منظور بهینه سازی استخراج DNA در روش‌های مورد استفاده تغییراتی بـه شـرح زیـر صـورت پـذیرفت. در روش ژانـگ و همکاران (۱۸) به جای استفاده از ۵ میکرولیتر Proteinase K بـرای حذف پروتئین از ۵ میکرولیتر لیزوزیم استفاده شد. نتایج نشان دهنـده

کار آمد بودن لیزوزیم در استخراج DNA بود. در روش سیلوا و همکاران (۱۷) نحوه خرد کردن نماتدها تغییر کرد. در روش لیوآ و همکاران (۱۰)، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر پیشنهادی در سه مرحله رشدی نماتد به ۱۶ میکرولیتر کاهش یافت از بافر استخراج که در روش لیوآ عبارت بود از (2.5 mM DTT, 1.25% Tween20, 0.025% gelatin, (125mM KCL, 25mM Tris HCL (pH 8.3) 3.75 mM $Mgcl_2$) که به جای این بافر استخراج بافری با فرمول (0.2M Nacl, 0.2M Tris-Hcl (pH8) ,1%(V/V) β-Mercaptoethanol) (۹)، استفاده گردید همچنین به جای ۸ میکرولیتر از بافر لیوآ میزان ۲۰ میکرولیتر از بافر جدید استفاده گردید.

جدول ۵- اطلاعات مربوط به کد نمونه، مناطق مختلف، تعداد نمونه و نتایج مرفولوژیکی و مولکولی با آغازگرهای مختلف *M. javanica* و *M. incognita*

Table 5- Information about sample code, different regions, number of samples and morphological and molecular results with different primers of *M. javanica* and *M. incognita*

کد نمونه Sample code	شهرستان County	منطقه نمونه برداری Sampled region	گلخانه Greenhouse	مزرعه Field	تعداد نمونه Number of samples	نتایج Results مورفولوژیکی Morphological	 آغازگرهای M.J M.J Primers	 آغازگرهای M.I M.I Primers
R	نورآباد Nourabad	رستم Rostam	خیار Cucumber		3	*M. javanica*	+	−
K	داراب Darab	فسارود Fasaroud		خیار Cucumber	5	*M. javanica*	+	−
N	داراب Darab	فسارود Fasaroud		گوجه فرنگی Tomato	5	*M. javanica*	+	−
G	داراب Darab	فسارود Fasaroud		بادمجان Eggplant	5	*M. javanica*	+	−
J	داراب Darab	جنت شهر Janatshahr	خیار Cucumber		10	*M. javanica*	+	−
F	استهبان Estahban	ایج Ij	خیار و ریحان Cucumber and Basil		5	*M. javanica*	+	−
P	کوار Kavar	کوار Kavar		گوجه فرنگی Tomato	3	*M.javanica*	+	−
H	شیراز Shiraz	باجگاه Bajgah	گوجه فرنگی Tomato		2	*M. javanica*	+	−
B	شیراز Shiraz	منزل مسکونی House		بادمجان Eggplant	2	نا شناس Unknown	−	−



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی حاصل از نتایج پی‌سی‌آر

A: نماتدهای جمع آوری شده از مناطق مختلف استان فارس که همه آنها بجز نمونه شماره ۹ باند 670bp ایجاد نمودند (در این الکتروفورز جفت آغازگر Fjav/Rjav که مربوط به ماده کامل گونه *M. javanica* است استفاده شد)، B: نماتدهای جمع آوری شده از مناطق مختلف استان که هیچ یک باند 955bp نشان ندادند (در این الکتروفورز جفت آغازگر MI-F/MI-R که مربوط به گونه *M. incognita* است استفاده شد). کد نمونه‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. M مارکر مولکولی شرکت سیناژن است.

Figure 1- Electrophoresis patterns of PCR products

A: Nematodes collected from different parts of Fars province, all of which formed 670bp band except for sample No. 9 (in this electrophoresis, Fjav / Rjav primer pair, which is related to the adult female of *M. javanica*, was used),), B: Nematodes collected from different parts of the province that did not show any 955 bp band (MI-F / MI-R primer pair belonging to *M. incognita* species was used in this electrophoresis). The sample code is given in Table 2. M is a molecular marker of Sinagen Company.

جدول ۶- مشخصات مورفومتریک ماده‌های بالغ و لاروهای سن دوم در جمعیت‌های *M. javanica*

Table 6- Morphometric characteristics of adult females and second instar larvae in *M. javanica* populations

مشخصات Characteristics	ماده‌ها (به میکرومتر) Females (in micrometers)	لاروهای سن دوم (به میکرومتر) Second instar larvae (in micrometers)
طول بدن Body length	690-964 (828.3)	395-420 (410.8)
عرض بدن Body width	350-530 (436)	9-11 (10.8)
طول استایلت Style length	15.5-18 (16)	10.5-13 (11.4)
ارتفاع گره استایلت Style knot height	2-3 (2.6)	1-1.6 (1.4)
عرض گره استایلت Style knot width	2-5 (4)	2.5-4 (2.2)
محل ریزش محتوای غده پشتی Valve of the dorsal gland	3-6 (4.6)	2.5-4 (3.2)
فاصله سر تا روزنه ترشحی Distance from head to the secretory orifice	42-47 (45)	-
حد فاصل انتهای بالایی تا مرکز حباب میانی The distance from the top end to the center of the middle bubble	90-96 (93.2)	-
طول شکاف فرج The length of the vaginal cleft	18-30 (25)	-
فاصله فرج تا مخرج The distance from the vulva to the anus	12-32 (17.5)	-
فاصله بین دو فازمید The distance between the two phasmids	20-30 (25)	-
طول دم Tail length	–	46-57 (52.4)
طول بخش شفاف انتهای دم The length of the transparent part of the tail end	–	11-16 (13)
طول بدن/طول دم Body length / tail length	–	7-9 (8.3)

همچنـین بـا جـایگزینی لیـزوزیم بـه میـزان ۴ میکرولیتـر (۲۰ میلی‌گرم لیزوزیم در ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCL با pH=8) بـه جـای پروتئیناز K نتایج مطلوب‌تری حاصل شد. همچنـین بـه منظـور خـرد کردن نماتدها به جای دمای ۷۰°c- درجه سانتی‌گـراد از دمـای۱۹۶- درجه سانتی‌گراد استفاده شد. در ادامه همانند روش لیواً سیکل دمـای ۶۵°c درجه سانتی‌گراد به مدت یـک سـاعت در حمـام بنمـاری و ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°c درجه سانتی‌گراد بـر روی دسـتگاه هـات پلیـت استفاده گردید کارآیی روش‌های استخراج در ردیابی مولکولی نماتد در جدول ۷ تنظیم شده است.

همان طور که در جدول ۷ مشاهده می‌گردد در روش بهینه شـده لیواً با تعداد ۱۰عدد نماتد و تک فرد از مراحل مختلـف جـواب مثبـت حاصل شده است که می توان این روش را بـه عنـوان بهتـرین روش استخراج قلمداد نمود.

بهینه‌سازی آغازگرها در تشخیص نماتد ریشه گرهی

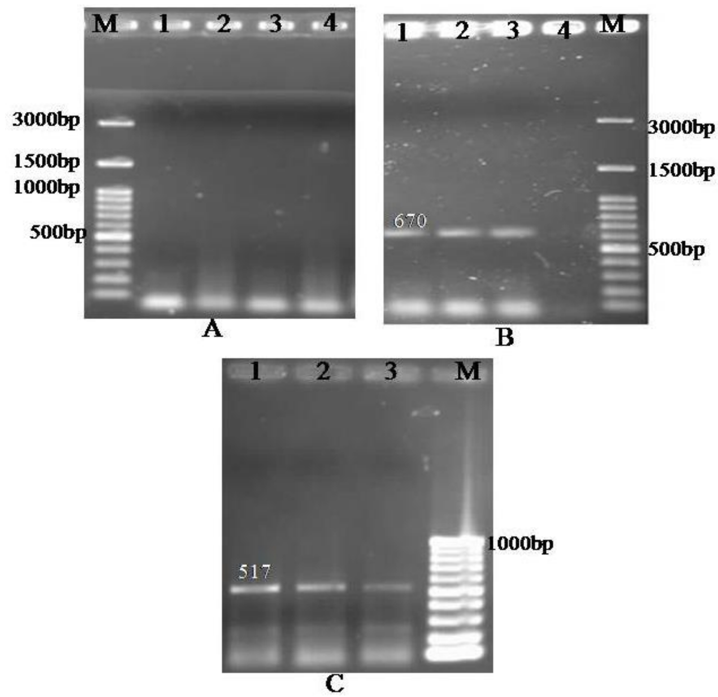
با توجه به اینکه در اکثر مناطق نماتد ردیابی شده *M. javanica* بوده است بنابراین آغازگرهای مربـوط بـه ایـن گونـه کـه در منـاطق مختلف مورد استفاده قرار گرفته بود (جـدول ۷) اسـتفاده شـد. بـدین منظور در بین سه جفت آغازگر مورد استفاده آغـازگر Fjav/Rjav کـه یک قطعه 670bp و Mj-MF/Mj-MR که یک قطعه 517bp ایجاد

می‌نمود عملکرد بهتری داشتند این آغازگرها با روش‌های مختلف استخراج و با مراحل رشدی و در جمعیت‌های مختلف و تک فرد نماتد آزمایش شد که نتایج مطلوبی بدست آمد. آغازگر Mj-DF/Mj-DR که یک قطعه 1650bp می‌نمود در مرحله رشدی تک لارو سن دوم قطعه مورد نظر را ایجاد نکرد. مقایسه توان آغازگرها در ردیابی نماتد ریشه گرهی گونه *M. javanica* در جدول ۸ تنظیم گردیده است. همچنین در شکل ۲ نتایج آزمون پی‌سی‌آر آورده شده است.

جدول ۷- مقایسه روش‌های بهینه استخراج در ردیابی مولکولی نماتد ریشه گرهی

Table 7- Comparison of optimal extraction methods in molecular tracing of root knot nematode

روش‌های استخراج Extraction methods	ماده کامل Adult female		کیسه تخم Egg sac		لارو سن دوم Larvae of the second instar	
روش بهینه شده ژانگ و همکاران (۱۹۹۸) Optimized method of Zhang et al. (1998)	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individuals	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1individuals	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individual
	+	–	+	–	–	–
روش بهینه شده سیلوا و همکاران (۲۰۰۰) Optimized method of Silva et al. (2000)	+	–	+	–	+	–
روش بهینه شده لیوآ و همکاران (۲۰۰۱) Optimized method of Liwa et al. (2001)	+	+	+	+	+	+



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی حاصل از پی‌سی‌آر

A: با جفت آغازگر Mj-DF/Mj-DR باند حاصله 1650bp، چاهک ۱ تک لارو سن دوم، چاهک ۲ تک ماده بالغ، چاهک ۳ تک کیسه تخم، چاهک ۴: کنترل منفی، B: با جفت آغازگر Fjav/Rjav باند حاصله 670bp، چاهک۱: تک لارو سن دوم، چاهک ۲: تک ماده بالغ، چاهک ۳:تک کیسه تخم، چاهک ۴: کنترل منفی C: با جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR باند حاصله 517bp چاهک ۱ تک لارو سن دوم، چاهک ۲: تک ماده بالغ، چاهک ۳: تک کیسه تخم، M: مارکر مولکولی شرکت سیناژن 3000bp - 100bp

Figure 2- Electrophoresis patterns of PCR products

A: using Mj-DF / Mj-DR primer pair formed 1650bp band, well 1: single second instar larvae, well 2: single adult female, well 3: single egg sac and well 4: negative control, B: using Fjav / Rjav primer pair formed 670bp band, well 1: single second instar larvae, well 2: single adult female, well 3: single egg sac and well 4: negative control C: using Mj-MF / Mj-MR primer pair formed 517bp band, well 1: single second instar larvae, Well 2: single adult female, Well 3: single egg sac, M: molecular marker of Sinagen 100bp - 3000bp

جدول ۸- مقایسه توان آغازگرها در ردیابی *M. javanica*

Table 8. Comparison of primer power in tracking *M. javanica*

نام آغازگر Primer name	ماده کامل Adult female		کیسه تخم Egg sac		لارو سن دوم Second instar larvae	
	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individual	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individual	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individual
Mj-DF/R	+	+	+	+	+	–
Fjav/Rjav	+	+	+	+	+	+
Mj-MF/R	+	+	+	+	+	+
Mi-F/R	–	–	–	–	–	–

+ : آغازگرها قادر به تکثیر هستند

+: Primers are able to reproduce

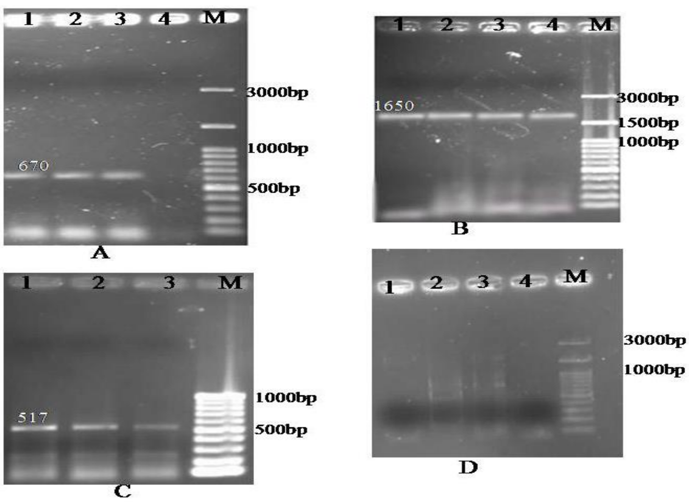
ـ : آغازگرها قادر به تکثیر نیستند

-: Primers are not able to reproduce

همان طور که در جدول ۸ مشاهده می‌گردد جفت آغازگر Mj-DF/R قادر به ردیابی تک لارو سن دوم نبوده است. جفت آغازگر Mi-F/R مربوط به شناسایی گونه *M. incognita* است در تمام موارد منفی ارزیابی گردید. این نشان از خالص بودن جمعیت‌های نماتد مورد استفاده می‌باشد.

بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها

بدین منظور در این تحقیق از دماهای مختلف و با سیکل‌های مختلف برای هر آغازگر با تعداد ۱۰ نماتد ماده بالغ استفاده شد که دمای بهینه شده مربوط به هر آغازگر در جدول ۷ آورده شده است تعداد سیکل بهینه هر کدام ۳۸ سیکل بدست آمد (جدول ۴).



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی حاصل از پی‌سی‌آر

A: جفت آغازگر Fjav/Rjav با دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد B: جفت آغازگر Mj-DF/Mj-DR با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد C: جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد D: چاهک یک: جفت آغازگر Mj-DF/Mj-DR با دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد، چاهک دو: جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR با دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد، چاهک سه: جفت آغازگر Fjav/Rjav با دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد، چاهک چهار: کنترل منفی.

Figure 3- Electrophoresis patterns of PCR products

A: Fjav / Rjav primer pair at 54 ° C B: Mj-DF / Mj-DR primer pair at 50 ° C, C: Mj-MF / Mj-MR primer pair at 56 ° C and D: Well 1, Mj-DF / Mj-DR primer pair at 53 ° C, well 2: Mj-MF / Mj-MR primer pair at 53 ° C, well 3: Fjav / Rjav primer pair at 53 ° C and well 4: negative control

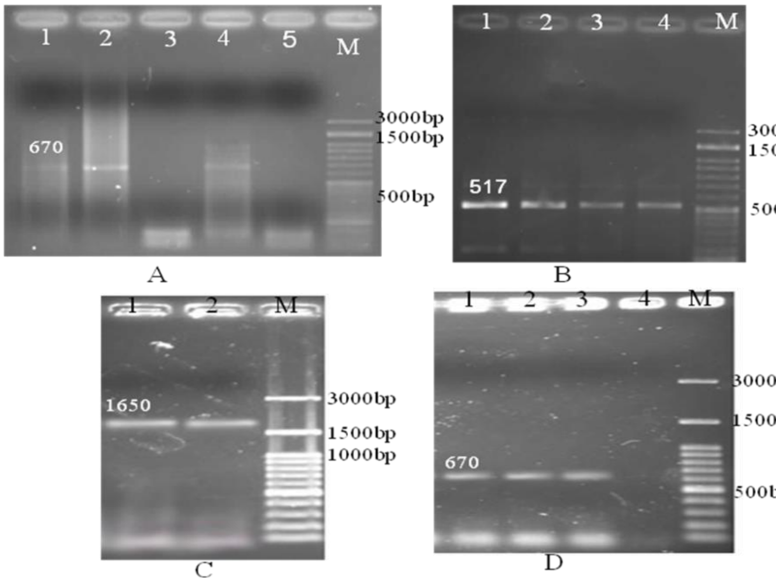
جدول ۹- دمای بهینه شده اتصال هر آغازگر

Table 9- Optimized annealing temperature of each primer

نام جفت آغازگر Name of the primer pair	دمای بهینه‌سازی شده Optimized temperature	اندازه باند مورد انتظار Expected band size
Fjav/Rjav	54	670bp
Mj-DF/Mj-DR	50	1650bp
Mj-MF/Mj-MR	56	517bp
MI-F/MIR	55	955bp

بهینه‌سازی اجزای پی‌سی‌آر

به منظور بهینه‌سازی اجزای پی‌سی‌آر از تغییر میزان DNA الگو و تغییر غلظت $Mgcl_2$ در روش‌های مختلف استخراج DNA و مراحل مختلف رشدی نماتد با آغازگرهای مختلف نماتد ریشه گره‌ای گونه *M. javanica* استفاده شد که در روش استخراج از ماده کامل وکیسه تخم با استفاده از هر سه روش استخراج برای پی‌سی‌آر از ۲ میکرولیتر DNA الگو و یک میکرولیتر $Mgcl_2$ ۵۰ میلی‌مولار در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد، نتایج نشان داد که این میزان از مواد ذکر شده برای هر سه جفت آغازگر کار آمد بود (شکل ۴). در مورد لارو سن دوم مقدار DNA الگو استخراجی به روش لیواً و همکاران (۱۰) به ۴ میکرولیتر و $Mgcl_2$ ۵۰ میلی‌مولار به ۱/۵ میکرولیتر افزایش یافت که برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری تنظیم گردید و برای هر سه جفت آغازگر کار آمد بود (شکل ۵).



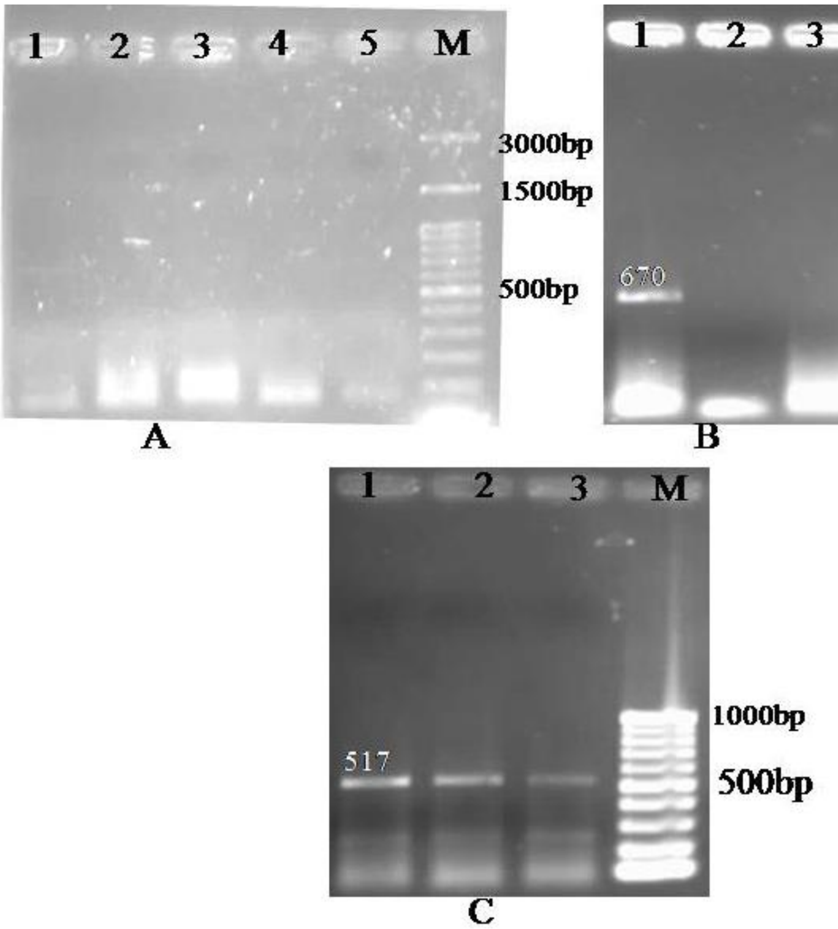
شکل ۴- نقوش الکتروفورزی حاصل از پی‌سی‌آر با افزودن میزان $MgCl_2$ از µ ۰/۷۵ به µ ۱ و افزایش DNA الگو از ۱µ به ۲µ

A: چاهک ۱ و ۲ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش سیلوا و همکاران (۲۰۰۰)، چاهک ۳ کنترل منفی، چاهک ۴ و ۵ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش ژانگ و همکاران (۱۹۹۸) با جفت آغازگر Fjav و Rjav، باند 670bp با استفاده از µ ۰/۷۵ $MgCl_2$ و میزان µ ۱ DNA الگو، B: چاهک ۱و۲ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش سیلوا، چاهک ۳ و ۴ تعداد۱۰ کیسه تخم استخراج به روش ژانگ با جفت آغازگر Mj-MF و Mj-MR باند 517bp با استفاده از میزانµ ۱ $MgCl_2$ و میزان µ ۲ DNA الگو، C: چاهک ۱ و ۲ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش سیلوا با جفت آغازگر Mj-DF/R باند 1650bp با استفاده از میزانµ ۱ $MgCl_2$ و میزان µ ۲ DNA الگو، D: چاهک ۱۰:۱ کیسه تخم، چاهک ۲:۱۰ ماده بالغ، چاهک ۳:۱۰ لارو سن دوم، روش استخراج سیلوا و چاهک ۴: کنترل منفی، با جفت آغازگر Fjav و Rjav باند 670bp با استفاده از میزان µ ۱ $MgCl_2$ و میزان µ ۲ DNA الگو و M: مارکر مولکولی شرکت سیناژن 100bp-3000bp.

Figure 4- Electrophoresis patterns of PCR products while increasing the amount of MgCl2 from 0.75 µ to ۱ µ and increasing the template DNA from 1 µ to 2 µ.

A: Wells 1 and 2: 10 egg sacs extracted by Silva et al. (2000), wells 3 negative control, wells 4 and 5: 10 egg sacs extracted by Zhang et al. (1998) with Fjav and Rjav primers, 670bp band formed by using 0.75 µ MgCl2 and 1 µ template DNA, B: wells 1 and 2, 10 egg sacs extracted by Silva method, wells 3 and 4, 10 egg sacs extracted by Zhang method with Mj-MF and Mj-MR primers, 517 bp band formed by using 1 µ MgCl2 and 2 µ template DNA, C: wells 1 and 2 includes 10 egg sacs extracted by Silva method with Mj-DF / R primer pair, 1650bp band formed using 1 µ MgCl2 and 2 µ template DNA, D: well 1: 10 egg sacs, well 2:10 adult females, well 3: 10 Second instar larvae extracted by Silva method, well 4: negative control, with Fjav and Rjav primer pairs, 670bp band formed using 1 µ MgCl2 and 2 µ template DNA, and M is molecular marker of Sinagen 100bp-3000bp.

همانطور که در شکل ۴- A مشاهده مـی‌گـردد، عـدم افـزایش میزان $MgCl_2$ و DNA الگو سبب ایجاد باندهـای ضـعیف تـر و در مواردی عدم ردیابی نماتد گردیده است.



شکل ۵- نقوش الکتروفورزی حاصل از پی‌سی‌آر با افزودن میزان $MgCl_2$ از µ ۰/۷۵ به ۱/۵µ و افزایش DNA الگو از ۱µ به ۲µ و ۴µ

A: هر ۵ چاهک DNA استخراج شده ازتک لارو سن دوم باروش لیواً و همکاران (۲۰۰۱) با کمک جفت آغازگر Fjav/Rjav با استفاده از میزان ۱/۵ میکرو لیتر $Mgcl_2$ ۵۰ میلی‌مولار و ۲ میکرولیتر DNA الگو B: چاهک ۱ تک لارو سن دوم روش استخراج لیواً با جفت آغازگر Fjav/Rjav با ۱/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$۵۰ میلی‌مولار و ۴ میکرولیتر DNA الگو، C: ۳ چاهک تک لاروسن دوم روش استخراج لیواً با جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR517bp که غلظت ۴ میکرولیتر DNA الگو و ۱/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ ۵۰ میلی‌مولار استفاده شده است.

Figure 5- Electrophoresis patterns of PCR products while increasing the amount of MgCl2 from 0.75 µ to 1.5 µ and increasing the template DNA from 1 µ to 2 µ and 4 µ

A: All 5 wells including DNA extracted from the second-instar larvae based on Liao et al. (2001) using Fjav / Rjav primer pair and applying 1.5 µl of 50 mM Mgcl2 and 2 µl of template DNA, B: well 1includes single second instar larvae by Liao extraction method with Fjav / Rjav primer pair applying 1.5 µl of 250 mM Mgcl2 and 4 µl of template DNA, C: 3 wells including single second instar larvae extracted based on Liao Method with Mj-MF / Mj-MR primer pair using 4 µl of template DNA and 1.5 µl of 50 mM Mgcl2.

همانطور در شکل ۵ مشاهده می گردد با افزودن میـزان $MgCl_2$ و DNA الگو و روش بهینه شده استخراج لیواً و همکاران (۱۰) قـادر به ردیابی کوچکترین واحد نماتد یعنی تک لارو آن گردیده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی نشان داد نماتد ریشه گرهی در اکثر مناطق نمونه‌بـرداری شـده اسـتان از گونـه *M. javanica* می‌باشد. برای تایید شناسایی مورفولوژیکی، از آغازگرهای اختصاصی این گونه که توسط زیجلسترا و همکاران (۲۰) و بر اسـاس روش اسکار طراحی شده است استفاده شد. نتـایج نشـان داد در تمـام مراحل رشدی براساس جمعیت و تک فرد، باند اختصاصی ۶۷۰ جفـت بازی تولید می‌شود. آغازگر اختصاصی که توسط دونگ و همکاران (۴)

بر اساس روش اسکار طراحی کرده‌اند نیز بررسی شد که نتایج نشان داد تمام مراحل رشدی نماتد، جمعیت، تک ماده بالغ و تک کیسه تخم باند اختصاصی ۱۶۵۰ جفت بازی تولید می‌کند. این آغازگر بر اساس تک لارو سن دوم نتوانست نماتد را ردیابی کند. بررسی‌ها در زمینه بهینه‌سازی روش‌های استخراج نشان داد استفاده از لیزوزم بافر به جای Protenase K بسیار کارآمد می‌باشد. نتایج نشان داد بهترین روش استخراج مخصوصا در مورد تک فرد نماتد در مراحل لارو سن دوم، تک ماده بالغ و تک کیسه تخم روش لیوآ و همکاران (۱۰) است. این می‌تواند بخاطر استفاده از سیکل دمایی در استخراج DNA باشد که نسبت به روش‌های دیگر قابل اطمینان‌تر است. در مورد دمای اتصال آغازگرها در محدوده ۴۸ تا ۶۴ درجه سانتی‌گراد امتحان شد که بهترین دما برای جفت آغازگر Fjav و Rjav ۵۴ درجه سانتی‌گراد بود. بهترین دما برای جفت آغازگر Mj-MF و Mj-MR ۵۶ درجه سانتی‌گراد و بهترین دما برای جفت آغازگر Mj-DF و Mj-DR ۵۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. آغازگر اختصاصی طراحی شده توسط منگ و همکاران (۱۳) بر اساس روش اسکار قادر به شناسایی نماتد در تمام مراحل رشدی آن و براساس جمعیت و تک فرد نماتد باند اختصاصی ۵۱۷ جفت بازی تولید نمود. این نتایج نشان می‌دهد که شناسایی گونه *M. javanica* بر اساس خصوصیات شبکه کوتیکولی انتهایی بدن و مورفومتریکی لاروهای سن دوم می‌تواند مفید و کار آمد باشد و برای تایید شناسایی مولکولی لازم می‌باشد. در این تحقیق که اجزای واکنش پی‌سی‌آر نسبت به روش استخراج DNA تغییر نمود و بهترین میزان موادی که در یک میکس پی‌سی‌آر استفاده شد بهینه گردید، که برای روش‌های بهینه شده استخراج ژانگ و همکاران (۱۸) و سیلوا و همکاران (۱۷) در تمام مراحل رشدی و در روش لیوآ و همکاران (۱۰) در مرحله رشدی ماده کامل و کیسه تخم صدق می‌کند. در مورد لارو سن دوم به روش لیوآ و همکاران (۱۰) غلظت $Mgcl_2$ و مقدار DNA الگو افزایش یافت و از مقدار آب موجود در میکس کاسته شد. لذا می‌توان جهت شناسایی گونه *M. javanica* در کنار روش‌های ریخت شناسی که مشکل، وقت گیر و نیازمند مهارت و توانایی زیاد می‌باشد از روش‌های استخراج DNA و آغازگرهای اختصاصی و مواردی که در این تحقیق بهینه گردید استفاده کرد. لذا در مورد نمونه B که متعلق به شهر شیراز می‌باشد جفت آغازگرهای گونه *M. javanici* و جفت آغازگر گونه *M. incognita* نتوانستند آن را ردیابی کنند جای تحقیق بیشتر دارد.

منابع

1- Adam M.A.M., Phillips M.A., and Blok V.C. 2005. Identification of *Meloidogyne* spp. from North East Libya and comparison of their inter and intra-specific genetic variation using RAPDs. Nematology 7(4): 599-609.

2- Askarian H., Sharif Nabi A., Mehdikhani Moghaddam E., and Akhavan A. 2009. Identification of *Meloidogyne javanica* species using morphological and morphometric properties and species specific primers in Kerman province. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 10(47): 279-289.

3- Decraemer W., and Hunt D.J. 2006. Structure and Classification. In: Plant nematology. Perry, N. R, and Moens, M. (ed.). CABI International. pp. 4-32.

4- Dong K., Dean R.A., Fortnum B.A., and Lewis S.A. 2001. Development of PCR primer to identify species of root knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M.incognita*and *M. javanica*. Nematropica 31: 273-282.

5- Esbenshade P.R., and Triantaphyllow A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 17: 6-20.

6- Fadavi Khalajloo Gh., Mehdikhani Moghaddam E., and Rouhani H. 2014. Intra-species genetic diversity of different populations of *Meloidogyne javanica* in tomato fields of North Khorasan province using RAPD-PCR marker. Journal of Plant Protection 6(1): 55-70.

7- Fargetette M., Lollier V., Philips M., Blok V., and Frutos R. 2005. AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agriculturalpests. Genetics 328: 455-462.

8- Gasser R.B. 2001. Identification of parasitic nematodes and study of genetic variabilitusing PCR approaches. Parasitic Nematodes Molecular Biology, Biochemistry and Immunology. CAB international, pp 53-82.

9- Holterman M., van der Wurff A., van den Elsen S., van Megen H., Bongers T., Holovachov O., and Helder J. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. Molecular Biology and Evolution 23(9): 1792-1800.

10- Liao J., Yang W., Feng Z., and Karssen G. 2005. Description of *Meloidogyne panyuensis* sp. n. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitic on peanut. Russian Journal of Nematology 13(2): 107-114.

11- Mehdikhani Moghaddam E., Kheiri A., and Mohammadi M. 2006. Protein motifs of different populations of two species, *M. javanica* and *M. incognita* in Iran by the SDS-PAGE method. 17^{th} Iranian Congress of Plant Protection, p. 489. (In Persian with English abstract)

12- Mehdikhani Moghaddam E., Kheiri A., and Mohammadi M. 2006. Molecular comparison of populations of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* in Iran by PCR-RFLP method. Journal of Water and Soil

Science 10(4): 405-410.

13- Meng Q.P., Long H., and Xu J.H. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathologica Sinica 34(3): 204-210.

14- Moens M., Perry R.N., and Starr J.L. 2009. Meloidogyne species–a diverse group of novel and important plant parasites. Root-knot nematodes, p 483.

15- Mokaram Hesar A., Mehdikhani Moghaddam E., and Tanha Maafi Z. 2010. Morphological and genetic variation among different populations of *M. javanica* on different hosts in fields of Khorasan Razavi province. 19^{th} Iranian Plant Protection Congress, p. 603.

16- Shokouhi A., Mirzaei M., and Amini M. 2012. Molecular investigation of root knot nematode, *M. javanica*, from Kerman using ribosomal DNA ITS sequencing. 20^{th} Iranian Congress of Plant Protection, p 654. (In Persian with English abstract)

17- Silva A.T., Peena J.C., Goulart L.R., Santos M.A., and Arantes N.E. 2000. Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* Ichinohe assessed by RAPD markers. Genetics and Molecular Biology 23(2): 323-329.

18- Zhang Y.P, Uymoto J.K., and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. Journal of Virological Methods 71: 45-50.

19- Zijlstra C. 2000. Identificatin of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. European Journal of Plant Pathology 106: 238-290.

20- Zijlstra C., Donkers-Venne D.T.H.M., and Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterize amplified region (SCAR) based PCR assays. Nematology 2: 847-853.

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 3, Fall 2020, P. 309-324

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۳۲۴-۳۰۹

Improving Molecular Diagnosis of Root Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*)

R. Keshavarz Kuhjerdi[1*]- A. Pakniat Jahromi[2]- M. Honarvar[3]- M. Pakniat Jahromi[4]

Received: 28-12-2019
Accepted: 24-02-2020

Introduction: Root-knot nematodes are the most common and destructive plant-parasitic nematode group worldwide and adversely influence many economically important crops, ornamental plants, and fruit trees. They are obligate parasites of the roots of many plant species, including herbaceous and woody plants. Symptoms associated with Root-knot nematodes infection include root galls, shoot chlorosis, stunted growth, nutrient deficiencies, and secondary infections by other pathogens. A high level of damage can lead to serious crop loss. Due to the considerable morphological similarity between species of *Meloidogyne* and high intraspecies variation, it is difficult to differentiate species from each other based on the morphology of their perineal patterns alone. Molecular techniques are used for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of species. Polymerase chain reaction (PCR) is a method widely used to rapidly make millions to billions of copies of a specific DNA sample, allowing scientists to take a very small sample of DNA and amplify it to a large enough amount to study in detail. The objective of this study was to improve molecular diagnosis of root knot nematode in vegetable crops in Fars province to enhance our diagnostic knowledge and allow species identification of root knot nematode through PCR by species-specific primers.

Materials and Methods: In 2012, in order to identify the different stages of growth of *Meloidogyne javanica* species, 40 soil and root samples infected with the nematode were collected from different cultivation sites of Fars province (Darab, Jannatshahr, Estahban, Nurabad, Qavar, and Shiraz). The roots of plants were flushed with water to remove soil and then washed with soap for 10 min. To obtain the pure population of each sample, a large egg bag containing more eggs was selected. The isolated egg bag was placed adjacent to Rutgers tomato transplant. After 70-60 days, the roots were removed from the pot and prepared to identify species of the nematode. After purification of nematodes using single egg method on Rutgers tomato root and diagnosis of them on the morphological basis, the DNA was extracted at different growth stage of nematode using three optimized methods of Zhang, 1998, Silva, 2000, and Liao, 2005. PCR products (5 µl) were separated on standard agarose gels. A DNA ladder (Sinagen 100bp-3000bp) was used to determine the molecular sizes of the bands. Band patterns were photographed under UV light using the GBOX document gel system. The PCR was optimized by varying the reaction components and cycling conditions. The annealing temperature was optimized separately for each primer based on the manufacturer's Tm and formula. The roots were flushed with water to remove soil and then washed with a 0.52% NaClO soap for 10 min. Individual root knots were obtained after three to five washes. Furthermore, DNA extraction was performed using four methods.

Results and Discussion: The root-knot nematodes were recovered from the vegetable crop soil samples. Species identification in this study was based on the PCR by species-specific primers. Specific primers of Fjav/Rjav, Mj-MF/Mj-MR and Mj-DF/Mj-DR could detect *M. javanica* with 670 bp, 517bp and 1650bp, respectively, proving their usefulness for PCR on root-knot nematodes. No band was detected using specific primer of *M. incognita* (MI-F/R primers) from the samples in PCR. During optimizing PCR method, it was revealed that the best annealing temperature is 54ºC for Mj-MF and Mj-MR primers, 56ºC for Mj-DF and Mj-DR primers, and 50ºC and for Fjav and Rjav primers. Adding the DNA extracted template from 1µ to 2µ for single female and single egg cist and from 2µ to 4µ for single juvenile made the best result for detection of root-knot nematode based on PCR. Changing the MgCl2 concentration from 1.5 mmol to 2 mmol in a 25µl PCR reaction made the best PCR result. The Liao optimized method was the best DNA extraction for monitoring *M. javanica*. Fjav/Rjav and Mj-MF/Mj-MR primers were the best primers in detecting *M. javanica.*

Conclusion: The results of this study showed a remarkable ability of DNA extraction methods, specific primers and the cases optimized in this study in identifying root knot nematode. Identifying *M. javanica* species

1- Former M.Sc. Student, Agricultural Engineering Horticultural Sciences, Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products, Estahban Branch, Islamic Azad University, Estahban, Iran
(*- Corresponding Author Email: rahman.keshavarz64@gmail.com)
2 and 4- Assistant Professors of Research, Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Zarghan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products, Estahban Branch, Islamic Azad University, Estahban, Iran

based on morphological methods is time consuming and difficult, and requires high skills and also needs to be examined for a particular stage of nematode growth. In addition, identifying of this species based on biochemical methods is time consuming, affected by environmental conditions, requires relatively large amounts of living organism and a particular stage of the nematode's life cycle. Given these difficulties, DNA extraction methods, specific primers and the cases optimized in this study can be used to identify *M. javanica* species. However, as *M. javanica* and *M. incognita* primer pairs were not detected for a sample taken from Shiraz, more researches are needed to be carried out on this case.

Keywords: *M. javanica*, PCR optimizing, Root-knot nematode, Specific primers